

CAPILLARYS / MINICAP URINE

Ref. 2013





2014/06

UTILIZACIÓN

El kit CAPILLARYS / MINICAP URINE permite la preparación de las muestras de orina para el análisis en medio alcalino (pH 9,9) de las proteínas urinarias humanas mediante electroforesis capilar en los instrumentos CAPILLARYS y MINICAP.
Los instrumentos CAPILLARYS y MINICAP permiten realizar todas las etapas de la electroforesis hasta la obtención del perfil proteico urinario para el análisis cualitativo, o cuantitativo en el caso del CAPILLARYS (con una versión de PHORESIS ≥ 8.61). Las proteínas, separadas en capilares de sílice fundido, son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar por espectrofotometría de absorbancia a 200 nm. Los perfiles electroforéticos son analizados visualmente para detectar las anomalías.

Para uso en diagnóstico *In Vitro*.

PRINCIPIO DEL TEST

La electroforesis de las proteínas de un líquido biológico humano es un análisis muy útil en el laboratorio de análisis clínicos para investigar las modificaciones del perfil proteico. Paralelamente a las técnicas de electroforesis en diferentes soportes, entre los que está el gel de agarosa, se ha desarrollado la técnica de la electroforesis capilar, que ofrece las ventajas de una automatización completa del análisis, separaciones rápidas y una buena resolución. Se define como una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 μm lleno de un tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida.
Los instrumentos CAPILLARYS y MINICAP usan el principio de la electroforesis capilar en solución libre, que representa la forma más corriente de electroforesis capilar. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de un pH dado, y, según el pH del electrolito, de un flujo electroendosmótico más o menos importante. El CAPILLARYS posee 8 capilares en paralelo, permitiendo realizar 8 análisis simultáneos. El MINICAP posee 2 capilares en paralelo, permitiendo realizar 2 análisis simultáneos. En estos instrumentos, la inyección en los capilares de la muestra previamente dializada y concentrada se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se lleva a cabo a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. La detección directa de las proteínas se efectúa a 200 nm en el lado catódico. Los capilares se lavan después con una solución de lavado, y luego con el tampón de análisis.
Con el tampón usado de pH alcalino, las proteínas urinarias son separadas en cinco zonas sucesivas en el orden siguiente : zona gamma, zona beta, zona alfa-2, zona alfa-1 y albúmina. Cada fracción contiene una o varias proteínas.

REACTIVO SUMINISTRADO EN EL KIT CAPILLARYS / MINICAP URINE

ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.

COMPONENTE	REF. N° 2013
Tampón de diálisis (solución concentrada)	1 vial de 480 mL

PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :

Los elementos de un mismo kit deben ser usados conjuntamente y según las instrucciones suministradas.

LEA DETENIDAMENTE LAS INSTRUCCIONES.

ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultra pura, como el agua para inyección.

TAMPÓN DE DIÁLISIS

Preparación

El contenedor del tampón de diálisis concentrado debe ser diluido 2 veces (v/v) con agua destilada o desionizada (1 volumen de tampón + 1 volumen de agua destilada o desionizada).
Después de la dilución, la solución contiene : tampón pH 9,9 ± 0,5 ; componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Tampón de diálisis de las orinas para el análisis mediante electroforesis capilar de las proteínas urinarias (ver "Preparación de las muestras").

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El tampón de diálisis concentrado puede conservarse a temperatura ambiente (de 15 a 30 °C) o en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del contenedor de tampón. No conserve el tampón cerca de una ventana o de una fuente de calor.
El tampón de diálisis diluido es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del contenedor de tampón, a temperatura ambiente o en nevera.

NOTA : Si el tampón de diálisis ha sido conservado en nevera, conviene atemperarlo antes de usarlo.

NO CONGELAR.
Deseche el tampón diluido si aparece turbidez debido a contaminación microbiana, precipitados o partículas en suspensión.

NOTA : Durante la conservación, el tampón concentrado puede adquirir un tono amarillento sin ningún efecto adverso en su funcionamiento.

TÉCNICA CAPILLARYS URINE

CAPILLARYS 1 y 2 versión 5.4x

ATENCIÓN : Esta versión no permite realizar el inmunotipado de las orinas.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.

1. KIT CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 (SEBIA, REFERENCIA 2003)

Presentación, conservación, estabilidad y señales de deterioro

Ver las instrucciones del kit.

IMPORTANTE : Los reactivos contenidos en el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 son necesarios para la realización de la técnica CAPILLARYS URINE.

Los segmentos de dilución transparentes contenidos en el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 no pueden ser usados para el análisis de muestras preparadas con los tubos Vivaspin® 6 ml.

2. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

Uso

Para la dilución de las muestras de orina, si es necesario, y la primera diálisis (ver "Preparación de las muestras").
Para lavar los capilares del sistema automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm) y con una resistividad superior a 10 Megaohmios x cm.
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas.
Para un funcionamiento óptimo, se recomienda añadir 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia n° 2059 : 1 vial de 5 mL).

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de agua, se recomienda lavarlo con agua destilada o desionizada en abundancia.

3. CAPICLEAN

Presentación

El vial de solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia n° 2058 : 1 vial de 25 mL) contiene : enzimas proteolíticos, surfactantes y componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del instrumento de electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.

IMPORTANTE :

- Cuando se realicen menos de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN al menos una vez por semana.
- Cuando se realicen menos de 500 análisis al día pero más de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN cada 500 análisis.
- Cuando se realicen más de 500 análisis al día, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN una vez al día.

Ver las instrucciones del CAPICLEAN, SEBIA.

IMPORTANTE : Después de la limpieza de la cánula de muestras, no reutilice el segmento de dilución.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO CONGELAR.
Puede observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial de CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.
No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.

4. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 - 3 % de cloro a partir de una dosis concentrada de 250 mL con un 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar cualquier proteína que se haya adsorbido a la cánula).

Ver el manual de instrucciones del CAPILLARYS, SEBIA.

- Use el cargador específico para el mantenimiento (n° 100).
- Coloque en este cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis con 2 mL de la solución de hipoclorito de sodio preparada anteriormente.
- Introduzca el cargador n° 100 de mantenimiento en el CAPILLARYS.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparecerá en pantalla, seleccione la opción "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio o solución de lavado CDT)", y luego valide.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio diluida puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de la luz solar y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de ácidos y amoniaco.

5. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

Preparación

Cada vial de solución de lavado concentrada CAPILLARYS / MINICAP (SEBIA, referencia n° 2052 : 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina de pH ≈ 12.

Uso

Para el lavado de los capilares del CAPILLARYS. Reactivo adicional necesario en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial. La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

NOTAS :

Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final del ± 5 % no afecta a la calidad del análisis.
El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro ≤ 0,45 µm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS SEBIA : CAPILLARYS referencia n° 1220 ó CAPILLARYS 2 referencia n° 1222.
2. Cargadores, suministrados con el sistema CAPILLARYS.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS : contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.
4. Para la diálisis y concentración de las muestras :
   - Sistema de diálisis SEBIA, referencia n° 9200 : 24 tubos de 20 mL con membrana PES 10.000 MWCO (peso molecular de corte de 10 KDa),

   o
   - Sistema de diálisis y concentración, tipo Vivaspin® 6 ml con membrana PES 10.000 MWCO (peso molecular de corte de 10 KDa), VIVASCIENCE,

   o cualquier otro sistema de funcionamiento equivalente, homologado para su uso en análisis clínicos.

   IMPORTANTE : Lea detenidamente las instrucciones de cada dispositivo de diálisis y concentración.
5. Centrífuga con rotor basculante equipada con soportes para tubos de 17 mm de diámetro y 122 mm de longitud (para la utilización de tubos Vivaspin® 6 ml), ó para tubos de 30 mm de diámetro y 116 mm de longitud (para la utilización de sistemas de diálisis SEBIA).
6. Segmentos de dilución verdes para CAPILLARYS, SEBIA, referencia n° 2081, para el análisis de muestras preparadas en concentradores Vivaspin® 6 ml.
7. Pipetas de 200 µL, 1 mL y 5 mL.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras

El análisis se realiza preferentemente con orinas frescas de 24 horas. Las orinas deben ser obtenidas según los métodos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las muestras pueden conservarse una semana en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones prolongadas, se recomienda congelar las muestras a – 70 °C ; las muestras congeladas son estables un mínimo de 1 mes.

IMPORTANTE : No congele las muestras a – 20 °C.

Las muestras degradadas o descongeladas pueden presentar fracciones deformadas con aparición de pequeños picos adicionales debido a la degradación de las proteínas.

NOTA : No conserve las muestras de orina a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras

Para una recuperación óptima de las proteínas urinarias, lo más recomendable es usar un concentrador de centrífuga para las etapas de diálisis / concentración.

IMPORTANTE : La técnica de análisis de las orinas mediante electroforesis capilar requiere la diálisis y concentración de las muestras con sistemas de diálisis SEBIA (tubos de 20 mL) ó con concentradores Vivaspin® 6 ml. Use un tubo por muestra.

Los parámetros indicados conciernen a la utilización de los sistemas de diálisis SEBIA o de los concentradores Vivaspin® 6 ml en centrífugas de rotor basculante. Lea detenidamente las instrucciones de los diferentes dispositivos de diálisis y concentración para su uso en centrífugas de rotor angular.

Antes del análisis, prepare cada muestra según uno de los dos modos operatorios siguientes :

NOTA : Diluya previamente a ½ (v/v) el tampón de diálisis concentrado con agua destilada o desionizada (1 volumen de tampón + 1 volumen de agua destilada o desionizada).

<u>Preparación de las muestras con el sistema de diálisis SEBIA (debe usarse con los segmentos de dilución transparentes del kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6)</u>

1. Mida la concentración de proteínas totales de la muestra de orina a analizar.
2. Centrifugue 5 mL de orina neta durante 10 minutos a 4.300 g*.
3. Recupere el sobrenadante.

4. Prepare cada muestra en un sistema de diálisis nuevo según su concentración de proteínas totales :
   - Concentración de proteínas totales inferior a 1 g/L : Mezcle 1 mL de orina con 9 mL de agua destilada o desionizada en el concentrador,
   - Concentración de proteínas totales comprendida entre 1 y 3 g/L : Mezcle 0,25 mL de orina con 10 mL de agua destilada o desionizada en el concentrador,
   - Concentración de proteínas totales superior a 3 g/L : Diluya primero la orina con agua destilada o desionizada para obtener una concentración de proteínas totales del orden de 3 g/L. Luego, mezcle 0,25 mL de orina diluida con 10 mL de agua destilada o desionizada.
5. Homogeneíce la orina diluida.
6. Equilibre los tubos con agua destilada o desionizada y centrifugue durante 30 minutos a 4.000 g*.

   ATENCIÓN : El volumen obtenido tras la concentración por centrifugación debe ser inferior o igual a 0,2 mL.
7. Para la diálisis, añada 10 mL de tampón de diálisis diluido a cada sistema de diálisis.
8. Equilibre los tubos con tampón de diálisis diluido y centrifugue de nuevo durante 30 minutos a 4.000 g*.
9. Después de la centrifugación, si el volumen obtenido es inferior a 0,2 mL, ajuste el contenido del tubo a 0,2 mL (cuando la parte inferior del menisco se haya equilibrado) con tampón de diálisis diluido.
10. Homogeneíce el contenido del tubo.
11. Tome 200 µL de orina dializada y dispénselos directamente en el pocillo de un **segmento de dilución transparente** nuevo.
12. Deseche el sistema de diálisis.

o

Preparación de las muestras con los concentradores Vivaspin® 6 ml (debe usarse solamente con los segmentos de dilución verdes)

1. Mida la concentración de proteínas totales de la muestra de orina a analizar.
2. Centrifugue 5 mL de orina neta durante 10 minutos a 4.300 g*.
3. Recupere el sobrenadante.
4. Prepare cada muestra en un concentrador Vivaspin® 6 ml nuevo según su concentración de proteínas totales :
   - Concentración de proteínas totales inferior a 1 g/L : Mezcle 0,5 mL de orina con 5,5 mL de agua destilada o desionizada,
   - Concentración de proteínas totales comprendida entre 1 y 3 g/L : Mezcle 0,125 mL de orina con 6 mL de agua destilada o desionizada,
   - Concentración de proteínas totales superior a 3 g/L : Diluya primero la orina con agua destilada o desionizada para obtener una concentración de proteínas totales del orden de 3 g/L. Luego, mezcle 0,125 mL de orina diluida con 6 mL de agua destilada o desionizada.
5. Homogeneíce la orina diluida.
6. Equilibre los tubos con agua destilada o desionizada y centrifugue durante 30 minutos a 3.500 g*.

   ATENCIÓN : El volumen obtenido tras la concentración por centrifugación debe ser inferior o igual a 0,1 mL.
7. Vacíe la parte inferior del concentrador Vivaspin®.
8. Para la diálisis, añada 6 mL de tampón de diálisis diluido a cada concentrador Vivaspin®.
9. Equilibre los tubos con tampón de diálisis diluido y centrifugue de nuevo durante 30 minutos a 3.500 g*.
10. Después de la centrifugación, si el volumen obtenido es inferior a 0,1 mL, ajuste el contenido del tubo a 0,1 mL (cuando la parte inferior del menisco se haya equilibrado) con tampón de diálisis diluido.
11. Homogeneíce el contenido del tubo.
12. Tome 100 µL de orina dializada y dispénselos directamente en el pocillo de un **segmento de dilución verde** nuevo.
13. Deseche el concentrador Vivaspin®.

IMPORTANTE : Las muestras deben ser analizadas como mucho el día siguiente a su preparación. Para limitar la adsorción de las proteínas urinarias en la membrana del dispositivo de diálisis y concentración (tubo Vivaspin® 6 ml ó sistema de diálisis SEBIA), se recomienda no conservar la muestra en el tubo después de la centrifugación, sino en un microtubo conservado en nevera (entre 2 y 8 °C).

** Consulte las instrucciones de la centrífuga para calcular el número de revoluciones por minuto correspondiente al tipo de rotor usado.*

Las condiciones de utilización de los dispositivos de diálisis y concentración son diferentes en las centrífugas de rotor basculante y en las de rotor angular, lea detenidamente las instrucciones correspondientes.

Muestras a descartar

- No use muestras de orina antiguas o mal conservadas, ya que las fracciones estarían muy modificadas debido a la degradación de las proteínas urinarias.
- Se recomienda observar el aspecto de la orina después de la primera centrifugación (10 minutos a 4.300 g) (por si hay hemólisis o turbidez).
- No use una muestra que haya sido conservada en un dispositivo de diálisis y concentración, ya que algunas proteínas podrían haberse adsorbido a la membrana.
- No use una muestra que haya sido conservada más de 30 minutos en el segmento de dilución después de la preparación.

PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las proteínas urinarias en 8 capilares en paralelo según las etapas siguientes :

- lectura del código de barras del cargador ;
- lavado de los capilares ;
- inyección de las muestras ;
- separación y detección directa de las proteínas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes :
- preparación (diálisis y concentración) de las muestras ;
- dispensación de las muestras preparadas en los pocillos del segmento de dilución (transparente o verde según el dispositivo de diálisis y concentración usado) ;
- colocación del segmento de dilución que contiene las muestras en el cargador, con identificación manual de las muestras ;
- introducción en el sistema CAPILLARYS ;
- recuperación de los cargadores después del análisis.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Encienda el CAPILLARYS y el ordenador de control.
2. Abra el programa de gestión PHORESIS y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente.
3. Analice las muestras preparadas con el kit CAPILLARYS / MINICAP URINE con el programa de análisis "URINE" y el tampón de análisis CAPILLARYS PROTEIN(E) 6. Para seleccionar el programa de análisis "URINE" y conectar el contenedor de tampón CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 al aparato, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS.
4. Coloque en cada cargador un segmento de dilución nuevo que contenga las muestras preparadas anteriormente, a razón de 100 µL de muestra por pocillo de un segmento de dilución verde ó 200 µL por pocillo de un segmento de dilución transparente (En caso de ausencia del segmento, el cargador será expulsado).

   IMPORTANTE : Si el número de muestras a analizar es inferior a 8, ponga agua destilada o desionizada en los pocillos que no contengan muestra.
5. Introduzca el (o los) cargador(es) completo(s) en el sistema CAPILLARYS por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta cuatro cargadores sucesivamente, pudiéndose introducir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos.
6. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
7. Coja con precaución el segmento de dilución usado y tírelo.

   ATENCIÓN : Manipule con precaución los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.

DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura del código de barras del cargador que contiene el segmento de dilución con las muestras de orina a analizar.
2. Lavado de los capilares.
3. Inyección de las muestras en los capilares.
4. Migración a voltaje constante con temperatura controlada por efecto Peltier, durante unos 4 minutos.
5. Lectura a 200 nm y aparición simultánea del perfil proteico en la pantalla del ordenador.

   NOTA : Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cargador introducido : los perfiles correspondientes se obtienen al cabo de 10 minutos. Para el cargador siguiente, la fase 1 (lectura del código de barras del cargador) se realiza durante la fase 4 (migración) del cargador anterior.

II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al final del análisis, los perfiles electroforéticos pueden ser analizados visualmente para detectar las anomalías. Las posiciones de las diferentes zonas proteicas (Albúmina, Alfa 1, Alfa 2, Beta y Gamma) aparecen en la ventana de edición y en el informe de resultados.

NOTA : En cada uno de los 3 protocolos de preparación de la muestra, la amplitud de la curva mostrada en la pantalla refleja la concentración de proteínas totales de la muestra analizada.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

III. FIN DE LA SECUENCIA DE ANÁLISIS

El usuario debe realizar el procedimiento de extinción al final de la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS permite una gestión automática de los reactivos.

IMPORTANTE : Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores (si no se hace correctamente los contenedores pueden despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores contenedor – conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos :
- colocar un nuevo contenedor de tampón de análisis y / o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y / o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y / o,
- vaciar el contenedor de desechos.

ATENCIÓN : No use agua destilada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultra pura, como el agua para inyección.

IMPORTANTE : Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

VER EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

RESULTADOS

Interpretación

La interpretación es cualitativa.

Para facilitar la interpretación de los perfiles, es posible superponer el Suero Control Normal (SEBIA, referencia n° 4785) para obtener un perfil de referencia. Para ello, reconstituya el suero control liofilizado con agua destilada o desionizada, dilúyalo a 1/40 con el tampón de diálisis diluido y luego analice directamente el suero diluido como una muestra de orina.

Proteinuria fisiológica : Es débil, en general inferior a 120 mg / 24 horas. No hay diferencias significativas entre los perfiles obtenidos en hombres y mujeres. La proteína predominante es la albúmina, asociada eventualmente a la transferrina y a trazas de inmunoglobulinas. Toda proteinuria superior a 120 mg / 24 horas debe ser considerada como patológica.
Una proteinuria positiva (> 120 mg / 24 horas) debería ser examinada con más detalle mediante un análisis cualitativo de las proteínas eliminadas.

La electroforesis de orina se realiza para investigar la presencia de componentes monoclonales, en particular las proteínas de Bence Jones (o cadenas ligeras libres monoclonales), o de otras proteínas urinarias. Una deformación del perfil respecto al normal es indicadora de una anomalía, especialmente la aparición de un pico adicional en la zona de las gammaglobulinas o de las betaglobulinas.
La tecnología de la electroforesis de orina permite alcanzar un límite de detección de las bandas monoclonales (inmunoglobulinas monoclonales o cadenas ligeras libres monoclonales) de unos 20 mg/L, satisfactorio para la mayoría de casos clínicos.
Todos los perfiles de aspecto monoclonal u oligoclonal deben ser confirmados con los kits de inmunofijación de SEBIA, HYDRAGEL BENCE JONES, HYDRAGEL IF ó HYDRAGEL URINE PROFIL(E), con los antisueros específicos anti-cadenas ligeras libres kappa o lambda.
Es necesario realizar análisis complementarios mediante electroforesis con las técnicas de SEBIA HYDRAGEL PROTEINURIE ó HYDRAGEL URINE PROFIL(E), o mediante determinaciones nefelométricas, para caracterizar las nefropatías tubulares, glomerulares o mixtas sospechadas después del análisis mediante electroforesis capilar.
Para obtener información complementaria sobre la interpretación de los perfiles obtenidos, ver la BIBLIOGRAFÍA.

Casos especiales :

- *Las orinas con una concentración inicial de proteínas totales inferior a 0,15 g/L pueden presentar un fondo proteico (arrastre) en todo el perfil.*
- *Cualquier anomalía sospechada en las zonas Beta o Gamma requiere la investigación posterior de la presencia de la proteína de Bence Jones, sea cual sea la concentración de proteínas totales de la muestra.*

Interferencias y limitaciones

Ver MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.

Analice únicamente muestras preparadas usando los dispositivos de diálisis y concentración recomendados en el párrafo "EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS", como los concentradores Vivaspin® 6 ml, los sistemas de diálisis SEBIA o cualquier sistema de funcionamiento equivalente homologado para su uso en diagnóstico clínico.
Una diálisis insuficiente de la muestra puede provocar la aparición de picos residuales no proteicos. En caso de sospechar una interferencia, se recomienda realizar una diálisis adicional de la muestra.
Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no hay garantías en cuanto a la detección total de todas las proteínas urinarias.

Asistencia técnica

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como la información relativa a la limpieza y eliminación de residuos, a las reglas de etiquetado y seguridad aplicadas por SEBIA, al embalaje para el transporte de muestras biológicas y a la descontaminación de los aparatos están disponibles en el DVD "INSTRUCTIONS & SAFETY DATA SHEETS".

CAPILLARYS 1 & 2 (versión PHORESIS ≥ 6.x)
CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING (versión PHORESIS ≥ 8.60)

NOTA : En estas instrucciones, el nombre "CAPILLARYS" es usado para designar los instrumentos CAPILLARYS, CAPILLARYS 2 y CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, SEBIA.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.

1. KIT CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 (SEBIA, REFERENCIA 2003)

Presentación, conservación, estabilidad y señales de deterioro

Ver las instrucciones del kit.

IMPORTANTE : Los reactivos contenidos en el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 son necesarios para la realización de la técnica CAPILLARYS URINE.

ATENCIÓN : No use los segmentos de dilución transparentes contenidos en el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 para la técnica CAPILLARYS URINE.

2. SUERO CONTROL NORMAL

Composición

El Suero Control Normal (SEBIA, referencia n° 4785) se obtiene a partir de una mezcla de sueros humanos normales. Un procedimiento de estabilización permite conservar el Suero Control Normal en forma liofilizada.

Aplicación

El Suero Control Normal está destinado, **antes de iniciar una nueva serie de análisis**, a la normalización de los capilares y al control de migración de las proteínas urinarias separadas con la técnica electroforética CAPILLARYS URINE.
Reconstituya cada vial liofilizado de Suero Control Normal con 1 mL de agua destilada o desionizada. Deje reposar 30 minutos y agite suavemente (evite la formación de espuma).
El Suero Control Normal reconstituido debe ser usado como un suero humano normal.
Ver el párrafo "Preparación del análisis electroforético" para la normalización de los capilares.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Antes de la reconstitución, el Suero Control Normal debe conservarse en nevera hasta la fecha de caducidad indicada en los viales o la caja.
El Suero Control Normal reconstituido debe conservarse en nevera y usarse en el plazo de una semana para evitar que se contamine o desnaturalice.
Puede congelarse (en alícuotas) y conservarse un máximo de 6 meses a - 18 / - 30 °C.
El Suero Control Normal descongelado debe conservarse en nevera y usarse ese mismo día.
NOTA : Para un uso óptimo del Suero Control Normal en el CAPILLARYS, se recomienda alicuotarlo en microtubos antes de congelarlo.

NOTA : Durante el transporte, el Suero Control liofilizado puede permanecer a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) durante 15 días sin que la calidad del test se vea afectada.

Como ningún test puede proporcionar una garantía absoluta de la ausencia de los virus VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C o de cualquier otro agente infeccioso, el Suero Control Normal debe ser manipulado con las precauciones habituales para evitar contaminarse.
Este suero control, analizado usando técnicas aceptadas por una autoridad competente (FDA, ANSM…), es negativo :
- para la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B,
- para la presencia de anticuerpos anti-VHC,
- para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y anti-VIH 2.

3. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

Uso

Para la dilución de las muestras de orina, si es necesario, y la primera diálisis (ver "Preparación de las muestras").
Para lavar los capilares del sistema automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm) y con una resistividad superior a 10 Megaohmios x cm.
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas.
Para un funcionamiento óptimo, se recomienda añadir 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia n° 2059 : 1 vial de 5 mL).
IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de limpieza, se recomienda lavarlo con agua destilada o desionizada en abundancia.

4. CAPICLEAN

Presentación

El vial de solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia n° 2058 : 1 vial de 25 mL) contiene : enzimas proteolíticos, surfactantes y componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del instrumento de electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.
IMPORTANTE :
- Cuando se realicen menos de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN al menos una vez por semana.
- Cuando se realicen menos de 500 análisis al día pero más de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN cada 500 análisis.
- Cuando se realicen más de 500 análisis al día, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN una vez al día.

Ver las instrucciones del CAPICLEAN, SEBIA.

IMPORTANTE : Después de la limpieza de la cánula de muestras, no reutilice el segmento de dilución.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO CONGELAR. Puede observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial de CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.
No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.

5. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 - 3 % de cloro a partir de una dosis concentrada de 250 mL con un 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar cualquier proteína que se haya adsorbido a la cánula).

Ver el manual de instrucciones del CAPILLARYS, SEBIA.

- Use el cargador específico para el mantenimiento (n° 100).
- Coloque en este cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis con 2 mL de la solución de hipoclorito de sodio preparada anteriormente.
- Introduzca el cargador n° 100 de mantenimiento en el CAPILLARYS.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparecerá en pantalla, seleccione la opción "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio)", y luego valide.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de la luz solar y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de ácidos y amoniaco.

6. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

Preparación

Cada vial de solución de lavado concentrada CAPILLARYS / MINICAP (SEBIA, referencia n° 2052 : 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina de pH ≈ 12.

Uso

Para el lavado de los capilares del CAPILLARYS. Reactivo adicional necesario en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial. La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

NOTAS :

Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final del ± 5 % no afecta a la calidad del análisis.
El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro ≤ 0,45 µm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS SEBIA : CAPILLARYS referencia n° 1220, CAPILLARYS 2 referencia n° 1222 ó CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING referencia n° 1227.
2. Cargadores, suministrados con el sistema CAPILLARYS.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS : contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.
4. Sistema de diálisis SEBIA, referencia n° 9200, 24 tubos de 20 mL con membrana PES 10 000 MWCO (peso molecular de corte de 10 KDa), para la diálisis y concentración de las muestras,
   o cualquier otro sistema de funcionamiento equivalente, homologado para su uso en análisis clínicos, que permita obtener un volumen final de muestra dializada y concentrada de 500 µL (volumen necesario para realizar los análisis con las técnicas CAPILLARYS URINE e IMMUNOTYPING URINE).
   IMPORTANTE : Lea detenidamente las instrucciones de cada dispositivo de diálisis y concentración.
5. Centrífuga con rotor basculante equipada con soportes para tubos de 30 mm de diámetro y 116 mm de longitud para la utilización de los sistemas de diálisis SEBIA.
6. Segmentos de dilución verdes para CAPILLARYS, SEBIA, referencia n° 2081.
7. Pipetas de 200 µL, 1 mL y 5 mL.
8. Microtubos de 1,5 mL.
9. Tubos de hemólisis de 75 mm de altura y 13 mm de diámetro.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras

El análisis se realiza preferentemente con orinas frescas de 24 horas. Las orinas deben ser obtenidas según los métodos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las muestras pueden conservarse una semana en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones prolongadas, se recomienda congelar las muestras a – 70 °C ; las muestras congeladas son estables un mínimo de 1 mes.

IMPORTANTE : No congele las muestras a – 20 °C.

Las muestras degradadas o descongeladas pueden presentar fracciones deformadas con aparición de pequeños picos adicionales debido a la degradación de las proteínas.

NOTA : No conserve las muestras de orina a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras (con los sistemas de diálisis SEBIA)

Para una recuperación óptima de las proteínas urinarias, lo más recomendable es usar un concentrador de centrífuga para las etapas de diálisis / concentración.

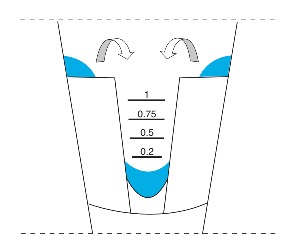
IMPORTANTE : La técnica de análisis de las orinas mediante electroforesis capilar requiere la diálisis y concentración de las muestras con sistemas de diálisis SEBIA (tubos de 20 mL). Use un tubo por muestra.

Los parámetros indicados son aplicables a la utilización de los sistemas de diálisis SEBIA en centrífugas de rotor basculante. Lea detenidamente las instrucciones de los diferentes dispositivos de diálisis y concentración para su uso en centrífugas de rotor angular.

Antes del análisis, prepare cada muestra según el modo operatorio siguiente :

NOTA : Diluya previamente a ½ (v/v) el tampón de diálisis concentrado con agua destilada o desionizada (1 volumen de tampón + 1 volumen de agua destilada o desionizada).

1. Mida la concentración de proteínas totales de la muestra de orina a analizar.
   ATENCIÓN : En el caso de la cuantificación de un componente monoclonal para el seguimiento de un paciente, es necesario usar siempre la misma técnica de determinación de las proteínas urinarias.
2. Centrifugue 5 mL de orina neta durante 10 minutos a 4.300 g*.
3. Recupere el sobrenadante.
4. Prepare cada muestra en un sistema de diálisis nuevo según su concentración de proteínas totales :
   - Concentración de proteínas totales inferior a 1 g/L : Mezcle 2 mL de orina con 18 mL de agua destilada o desionizada,
   - Concentración de proteínas totales comprendida entre 1 y 3 g/L : Mezcle 0,5 mL de orina con 19,5 mL de agua destilada o desionizada,
   - Concentración de proteínas totales superior a 3 g/L : Diluya primero la orina con agua destilada o desionizada para obtener una concentración de proteínas totales del orden de 3 g/L. Luego, mezcle 0,5 mL de orina diluida con 19,5 mL de agua destilada o desionizada.
5. Homogeneíce la orina diluida.
6. Equilibre los tubos con agua destilada o desionizada y centrifugue durante 40 minutos a 4.000 g*.
   ATENCIÓN : El volumen obtenido tras la concentración por centrifugación debe ser inferior o igual a 0,5 mL.
7. Para la diálisis, complete el sistema de diálisis hasta 20 mL con tampón de diálisis diluido.
8. Equilibre los tubos con tampón de diálisis diluido y centrifugue de nuevo durante 40 minutos a 4.000 g*.
9. Después de la centrifugación, una parte de la muestra puede permanecer retenida en la zona plana superior del sistema de diálisis (ver el esquema adjunto). Con una micropipeta, transfiera esta parte de la muestra al pocillo inferior del sistema de diálisis. Si el volumen obtenido es inferior a 0,5 mL, ajuste el contenido del tubo hasta 0,5 mL (cuando la parte inferior del menisco se haya equilibrado) con tampón de diálisis diluido.



10. Homogeneíce el contenido del tubo.
11. Tome el contenido del tubo (orina dializada) y dispénselo en un microtubo de 1,5 mL.
12. Deseche el sistema de diálisis.

IMPORTANTE : Las muestras deben ser analizadas como mucho el día siguiente a su preparación. Para limitar la adsorción de las proteínas urinarias a la membrana del dispositivo de diálisis y concentración (sistema de diálisis SEBIA), se recomienda no conservar la muestra en el sistema de diálisis después de la centrifugación, sino en un microtubo conservado en nevera (entre 2 y 8 °C).

** Consulte las instrucciones de la centrífuga para calcular el número de revoluciones por minuto correspondiente al tipo de rotor usado.*

Las condiciones de utilización de los dispositivos de diálisis y concentración son diferentes en las centrífugas de rotor basculante y en las de rotor angular. Los parámetros indicados anteriormente son aplicables a la utilización de los sistemas de diálisis SEBIA en centrífugas de rotor basculante. Lea detenidamente las instrucciones de los diferentes dispositivos de diálisis y concentración para su uso en centrífugas de rotor angular.

Muestras a descartar

- No use muestras de orina antiguas o mal conservadas, ya que las fracciones estarían muy modificadas debido a la degradación de las proteínas urinarias.
- Se recomienda observar el aspecto de la orina después de la primera centrifugación (10 minutos a 4.300 g) (por si hay hemólisis o turbidez).
- No use muestras que hayan sido conservadas en un dispositivo de diálisis y concentración, ya que algunas proteínas podrían haberse adsorbido a la membrana.
- No reutilice una muestra de orina que haya sido dispensada en el segmento de dilución.

PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las proteínas urinarias en 8 capilares en paralelo según las etapas siguientes :

- lectura de los códigos de barras del cargador y de las muestras a analizar ;
- dispensación de las muestras en los pocillos del segmento de dilución a partir de los microtubos que contienen las muestras dializadas ;
- lavado de los capilares ;
- inyección de las muestras ;
- separación y detección directa de las proteínas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes :

- preparación (diálisis y concentración) de las muestras ;
- colocación de los microtubos (sin tapones) que contienen las muestras a analizar en los tubos de hemólisis que les servirán de soporte en el cargador ; cada tubo debe estar identificado con el código de barras de identificación específico correspondiente a la muestra a analizar ;
- colocación en el cargador de un segmento de dilución verde nuevo de 100 μL ;
- introducción en el sistema CAPILLARYS ;
- recuperación de los cargadores después del análisis y de los microtubos para su eventual análisis mediante inmunotipado.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

I. PREPARACIÓN EL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Encienda el CAPILLARYS y el ordenador de control.
2. Abra el programa de gestión PHORESIS y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente.
3. Las muestras preparadas deben ser analizadas con el programa de análisis "URINE" y el tampón de análisis CAPILLARYS PROTEIN(E) 6. Para seleccionar el programa de análisis "URINE" y conectar el contenedor de tampón CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 al aparato, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS.
4. **Normalice los capilares con el Suero Control Normal (ver el párrafo "Reactivos necesarios no suministrados").**

   IMPORTANTE : Es necesario normalizar los capilares antes de analizar muestras de orina en el sistema CAPILLARYS para poder analizarlas después con la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE.
   - En un tubo de hemólisis identificado con la etiqueta con el código de barras del Suero Control Normal, dispense 25 μL de Suero Control Normal reconstituido y 2 mL de tampón de diálisis diluido ; luego, homogeneíce bien la mezcla.
   - Ponga este tubo de hemólisis en la posición 1 del cargador específico n° 0 del CAPILLARYS, previsto a este efecto, equipado con un segmento de dilución verde nuevo (en caso de ausencia del segmento aparecerá un mensaje de advertencia).
   - Inicie la normalización de los capilares : Introduzca el cargador n° 0 en el CAPILLARYS, seleccione en la ventana que aparecerá en pantalla "Normal Control" y valide.

   Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los datos.
5. Analice las muestras preparadas con el kit CAPILLARYS / MINICAP URINE :
   - Cada cargador posee 8 posiciones para tubos. Coloque hasta 8 tubos de hemólisis vacíos (que servirán de soporte para los microtubos) en cada cargador, y luego los microtubos que contengan las muestras dializadas, cortando antes el tapón de cada microtubo.
   - Conserve los tapones de cada microtubo para la conservación posterior de las muestras, si es necesario.

   IMPORTANTE : Se recomienda identificar los tubos de hemólisis que servirán de soporte de los microtubos que contengan las muestras a analizar con las etiquetas con código de barras de identificación correspondientes a las muestras. Esta identificación permitirá seleccionar el modo de dilución necesario para la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE.
   - Ponga los códigos de barras de cada tubo orientados hacia la ventana de lectura.

   NOTA : Si el número de muestras a analizar es inferior a 8, complete el cargador con tubos que contengan agua destilada o desionizada.
   - Coloque en cada cargador un segmento de dilución verde nuevo ; en caso de ausencia del segmento, el cargador será expulsado.
   - Introduzca el (o los) cargador(es) completo(s) en el sistema CAPILLARYS por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta trece cargadores sucesivamente, pudiéndose introducir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos.
6. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
7. Coja con precaución el segmento de dilución usado y tírelo.

   ATENCIÓN : Manipule con precaución los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.
8. Saque del cargador los microtubos que contienen las muestras de orina analizadas y consérvelos en nevera (entre 2 y 8 °C) para un análisis posterior con la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE, si es necesario.

DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras del cargador y de las muestras de orina a analizar.
2. Distribución de las muestras en el segmento de dilución, con limpieza de la cánula de muestras entre cada dilución.
3. Lavado de los capilares.
4. Inyección de las muestras en los capilares.
5. Migración a voltaje constante con temperatura controlada por efecto Peltier, durante unos 4 minutos.
6. Lectura a 200 nm y aparición simultánea del perfil proteico en la pantalla del ordenador.

NOTA : Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cargador introducido : los perfiles correspondientes a las muestras analizadas se obtienen al cabo de 10 minutos. Para el cargador siguiente, las fases 1 y 2 (lectura de los códigos de barras y distribución de las muestras) se realizan durante la fase 5 (migración) del cargador anterior.

II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al final del análisis, los perfiles electroforéticos pueden ser examinados visualmente para detectar las anomalías. Las posiciones de las diferentes zonas proteicas (Albúmina, Alfa 1, Alfa 2, Beta y Gamma) aparecen en la ventana de edición y en el informe de resultados.

NOTA : En cada uno de los 3 protocolos de preparación de la muestra, la amplitud de la curva mostrada en la pantalla refleja la concentración de proteínas totales de la muestra analizada.

Para el inmunotipado, los picos anormales deben ser integrados con la herramienta de integración de picos del programa, y el "Ratio orina", definido por la proporción de la superficie del pico anormal respecto a la superficie total de las proteínas del Suero Control Normal, es entonces calculado automáticamente ; aparecerá en la ventana de edición de las curvas. Este ratio será usado en la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE para determinar el modo de dilución de la muestra que se aplicará ("HIPOGAMMA", "ESTÁNDAR" o "HIPERGAMMA").

En caso de que el inmunotipado permita detectar un componente monoclonal, puede ser cuantificado (a partir de la versión de PHORESIS ≥ 8.61).
Para la cuantificación, los picos anormales deben ser integrados manualmente con la herramienta de integración de picos y la función "Cuantificar picos" del programa.
Se proponen dos modos de integración al usuario : integración "de valle a valle" o integración "hasta la línea de base". La elección del modo de integración se realiza en función del aspecto del perfil electroforético (posición del o de los picos de interés respecto a la línea de base) y de los procedimientos usados en el laboratorio.
Para un pico cuantificado, los resultados pueden ser obtenidos :

- en porcentaje,
- en concentración, en g/L ó en g/24 horas (en este caso, la concentración de proteínas urinarias de la muestra debe haber sido introducida previamente en la lista de trabajo).

NOTA : Los resultados obtenidos en la cuantificación de los picos monoclonales dependen completamente del valor de proteinuria introducido en el programa PHORESIS ; si el usuario comete un error al introducir el valor de proteinuria, este error repercutirá en el informe de resultados.

Si el pico monoclonal es pequeño, el uso del modo de integración "hasta la línea de base" puede dar lugar a una sobrestimación importante del mismo.
Para el seguimiento del paciente, el modo de integración de los picos monoclonales en el perfil electroforético debe ser el mismo en los diferentes análisis, y los análisis anteriores deben ser consultados para integrar siempre de la misma forma los picos monoclonales de interés. Además, cuando se observe una nueva modificación del perfil electroforético (fuera de la zona albúmina), se recomienda volver a realizar el inmunotipado de la muestra.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

III. FIN DE LA SECUENCIA DE ANÁLISIS

El usuario debe realizar un procedimiento de extinción al final de la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS permite una gestión automática de los reactivos.

IMPORTANTE : Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores (si no se hace correctamente los contenedores puede despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores contenedor – conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos :

- colocar un nuevo contenedor de tampón de análisis y / o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y / o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y / o,
- vaciar el contenedor de desechos.

ATENCIÓN : No use agua destilada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultra pura, como el agua para inyección.

IMPORTANTE : Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

VER EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

RESULTADOS

Interpretación

La interpretación es cualitativa.
Para facilitar la interpretación de los perfiles, se recomienda superponer un perfil obtenido en la normalización de los capilares con el Suero Control Normal, para obtener un perfil de referencia.

À partir de la versión de PHORESIS ≥ 8.61, la técnica CAPILLARYS URINE también es cuantitativa. En el caso de un perfil electroforético anormal, realice el inmunotipado de la muestra y después, si se detecta y caracteriza un componente monoclonal, cuantifíquelo según el protocolo descrito anteriormente.

Proteinuria fisiológica : Es débil, en general inferior a 120 mg / 24 horas. No hay diferencias significativas entre los perfiles obtenidos en hombres y mujeres. La proteína predominante es la albúmina, asociada eventualmente a la transferrina y a trazas de inmunoglobulinas. Toda proteinuria superior a 120 mg / 24 horas debe ser considerada patológica.
Una proteinuria positiva (> 120 mg / 24 horas) debería ser examinada con más detalle mediante un análisis cualitativo de las proteínas eliminadas.

La electroforesis de orina se realiza para investigar la presencia de componentes monoclonales, en particular las proteínas de Bence Jones (o cadenas ligeras libres monoclonales), o de otras proteínas urinarias. Una deformación del perfil respecto al normal es indicadora de una anomalía, especialmente la aparición de un pico adicional en la zona de las gammaglobulinas o de las betaglobulinas.
La tecnología de la electroforesis de orina permite alcanzar un límite de detección de las bandas monoclonales (inmunoglobulinas monoclonales o cadenas ligeras libres monoclonales) en el análisis cualitativo de unos 20 mg/L, satisfactorio para la mayoría de casos clínicos.
Todos los perfiles de aspecto monoclonal u oligoclonal deben ser confirmados usando :
- el kit de inmunotipado de SEBIA, CAPILLARYS IMMUNOTYPING ó,
- los kits de inmunofijación de SEBIA, HYDRAGEL BENCE JONES, HYDRAGEL IF ó HYDRAGEL URINE PROFIL(E), con los antisueros específicos anti-cadenas ligeras libres kappa o lambda.

Es necesario realizar análisis complementarios mediante electroforesis con las técnicas de SEBIA, HYDRAGEL PROTEINURIE ó HYDRAGEL URINE PROFIL(E), o mediante determinaciones nefelométricas, para caracterizar las nefropatías tubulares, glomerulares o mixtas sospechadas después del análisis por electroforesis capilar.
Para obtener información complementaria sobre la interpretación de los perfiles obtenidos, ver la BIBLIOGRAFÍA.

Casos especiales :
- *Las orinas con una concentración inicial de proteínas totales inferior a 0,15 g/L pueden presentar un fondo proteico (arrastre) en todo el perfil.*
- *Cualquier anomalía sospechada en las zonas Beta o Gamma requiere la investigación posterior de la presencia de la proteína de Bence Jones, sea cual sea la concentración de proteínas totales de la muestra.*

Interferencias y limitaciones

Ver MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.

Analice únicamente muestras preparadas usando los dispositivos de diálisis y concentración recomendados en el párrafo "EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS", como los sistemas de diálisis SEBIA o cualquier sistema de funcionamiento equivalente homologado para su uso en diagnóstico clínico.
Una diálisis insuficiente de la muestra puede provocar la aparición de picos residuales no proteicos. En caso de sospechar una interferencia, se recomienda realizar una diálisis adicional de la muestra.
Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no hay garantías en cuanto a la detección total de todas las proteínas urinarias.
En el caso de la cuantificación de un componente monoclonal para el seguimiento de un paciente, es necesario utilizar siempre la misma técnica de determinación de las proteínas urinarias.
Los resultados obtenidos en la cuantificación de los picos monoclonales dependen completamente del valor de proteinuria introducido en el programa PHORESIS ; si el usuario comete un error al introducir el valor de proteinuria, este error repercutirá en el informe de resultados.

Asistencia técnica

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como la información relativa a la limpieza y eliminación de residuos, a las reglas de etiquetado y seguridad aplicadas por SEBIA, al embalaje para el transporte de muestras biológicas y a la descontaminación de los aparatos están disponibles en el DVD "INSTRUCTIONS & SAFETY DATA SHEETS".

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Análisis cualitativo

Los resultados obtenidos mediante análisis cualitativo indican una muy buena repetibilidad y reproducibilidad de la técnica CAPILLARYS URINE en todos los aspectos probados.

Reproducibilidad intraserial

Dos muestras de orina patológicas (una con cinco fracciones proteicas y la otra con proteína de Bence Jones) y una orina normal (ninguna fracción detectada) han sido preparadas usando dos lotes diferentes de tampón de diálisis. Cada muestra, dispensada en todos los pocillos de un segmento de dilución, ha sido analizada con la técnica CAPILLARYS URINE con un tampón de análisis del mismo lote, a razón de una secuencia de análisis para cada lote de tampón de diálisis.
Las tres muestras analizadas proporcionan los mismos resultados con los dos lotes de tampón de diálisis probados, y los perfiles obtenidos son los característicos de cada una de las muestras.
En la técnica CAPILLARYS URINE, la electroforesis de proteínas no detecta ningún pico en la orina normal y muestra, en las 2 orinas patológicas, un perfil con todas las fracciones esperadas.

Reproducibilidad interserial e interlotes

Seis muestras de orina patológicas (que presentan de una a siete fracciones proteicas) y dos orinas normales (ninguna fracción anormal detectada) han sido preparadas usando tres lotes diferentes de tampón de diálisis. Cada muestra ha sido analizada con la técnica CAPILLARYS URINE con un tampón de análisis del mismo lote, a razón de 10 secuencias de análisis para cada lote de tampón de diálisis.
Todas las muestras analizadas proporcionan los mismos resultados con los 3 lotes de tampón de diálisis probados, y los perfiles obtenidos son los característicos de cada una de las muestras.
En la técnica CAPILLARYS URINE, la electroforesis de proteínas no detecta ningún pico anormal en las orinas normales, y detecta todas las fracciones esperadas en las 6 muestras patológicas.

Exactitud

Cien muestras de orina diferentes, con concentraciones de proteínas totales comprendidas entre 0,07 y 19,83 g/L, de las que 19 son normales y 81 patológicas, han sido analizadas mediante electroforesis capilar en el sistema CAPILLARYS con la técnica CAPILLARYS URINE y otro sistema comercial en gel de agarosa que no necesita concentrar la muestra.
Los resultados obtenidos muestran una correlación perfecta entre los dos sistemas de análisis en la detección de anomalías del perfil proteico, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % respecto a la técnica comparada, calculadas según el método recomendado (Wendling, 1986) :
En las 19 muestras de orina normales : correlación perfecta.
En las 81 muestras de orina patológicas : correlación perfecta.

Sensibilidad

La sensibilidad de la técnica CAPILLARYS URINE, obtenida por dilución serial de una orina con proteína de Bence Jones con una concentración inicial del orden de 0,34 g/L, es tal que el límite de detección de una proteína de Bence Jones es del orden de 20 mg/L.

NOTA : El límite de detección de un pico monoclonal puede variar en función de la posición del pico monoclonal y del fondo policlonal de la zona de las gamma y betaglobulinas.

<u>*Análisis cuantitativo*</u>

NOTA : El análisis cuantitativo puede realizarse en los instrumentos CAPILLARYS 2 y CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, y los resultados de la cuantificación de los componentes monoclonales son equivalentes entre los 2 instrumentos en los 2 modos de integración propuestos : integración hasta la línea de base e integración de valle a valle.

Repetibilidad intraserial y reproducibilidad interlotes, interpreparaciones e interinstrumentos

Tres (3) muestras diferentes de orinas patológicas con proteína de Bence Jones (orina n° 1 con cadena ligera libre monoclonal Kappa y una proteinuria de 0,28 g/L, orina n° 2 con cadena ligera libre monoclonal Kappa y una proteinuria de 2,90 g/L y orina n° 3 con cadena ligera libre monoclonal Lambda y una proteinuria de 5,49 g/L) han sido preparadas 3 veces sucesivas usando dos lotes de tampón de diálisis en cada preparación. A continuación, se ha evaluado la repetibilidad de cada muestra dializada con la técnica CAPILLARYS URINE en 2 instrumentos diferentes con un mismo lote de tampón de análisis, a razón de una secuencia de análisis por preparación.
Las tablas siguientes presentan las gamas de CV (%) obtenidos para la repetibilidad intraserial y la reproducibilidad interlotes, interpreparaciones y total de los porcentajes y concentraciones de componente monoclonal, según los 2 modos de integración (hasta la línea de base y de valle a valle).

Porcentajes de componente monoclonal	**Integración hasta la línea de base**		**Integración de valle a valle**	
	CV mín (%)	**CV máx (%)**	**CV mín (%)**	**CV máx (%)**
Repetibilidad intraserial (CV %)	0,2	2,1	0,5	3,8
Reproducibilidad interlotes (CV %)	0,5	3,5	1,0	4,5
Reproducibilidad interpreparaciones (CV %)	0,6	3,9	1,1	4,4
Total (CV %)	0,7	3,8	1,2	4,3

Concentraciones de componente monoclonal (g/L)	**Integración hasta la línea de base**		**Integración de valle a valle**	
	CV mín (%)	**CV máx (%)**	**CV mín (%)**	**CV máx (%)**
Repetibilidad intraserial (CV %)	0,0	2,6	0,0	4,5
Reproducibilidad interlotes (CV %)	0,5	3,9	1,0	5,2
Reproducibilidad interpreparaciones (CV %)	0,6	4,1	1,1	4,6
Total (CV %)	0,7	4,0	1,2	4,7

Exactitud

Cincuenta y seis (56) muestras de orina diferentes, con proteinurias comprendidas entre 0,09 y 20,69 g/L, de las que 9 muestras no presentan componente monoclonal y 47 sí, han sido analizadas en paralelo mediante electroforesis capilar con la técnica CAPILLARYS URINE con cuantificación y con una técnica comercial de electroforesis en gel de agarosa con lectura densitométrica que no necesita concentrar la muestra.
La correlación entre estas dos técnicas en el porcentaje y la concentración de los componentes monoclonales ha sido determinada usando herramientas estadísticas de regresión lineal.
Los resultados obtenidos han mostrado una correlación perfecta entre las dos técnicas en la cuantificación de componentes monoclonales presentes en cada muestra. Los parámetros de correlación entre los 2 sistemas de análisis (y = CAPILLARYS URINE) se presentan en las tablas siguientes para cada modo de integración.

Integración hasta la línea de base del componente monoclonal	**Coeficiente de correlación**	**Punto de corte en y**	**Pendiente**	**Límites de los valores CAPILLARYS URINE**
Porcentaje (%)	0,987	- 3,580	0,976	2,0 – 91,8
Concentración (g/L)	0,999	- 0,033	0,981	0,01 – 17,65

Integración de valle a valle del componente monoclonal	Coeficiente de correlación	Punto de corte en y	Pendiente	Límites de los valores CAPILLARYS URINE
Porcentaje (%)	0,990	- 1,525	0,952	0,6 – 87,7
Concentración (g/L)	0,999	- 0,019	0,971	0,00 – 15,58

Linealidad

Una orina con una proteinuria de 7,49 g/L con proteína de Bence Jones y una orina con una proteinuria de 6,03 g/L sin proteína de Bence Jones han sido mezcladas en proporciones variables, y las mezclas han sido analizadas con la técnica CAPILLARYS URINE con cuantificación mediante integración del componente monoclonal hasta la línea de base y de valle a valle.
Los resultados han mostrado que el porcentaje y la concentración del componente monoclonal están perfectamente correlacionados con la proporción de las 2 orinas en la mezcla, y que toda variación es detectada de forma lineal con la técnica CAPILLARYS URINE con los 2 modos de integración.
La técnica CAPILLARYS URINE es por tanto perfectamente lineal para el componente monoclonal en la gama de concentraciones estudiadas, entre 0,00 y 5,98 g/L con el modo de integración hasta la línea de base, y entre 0,00 y 5,65 g/L con el modo de integración de valle a valle.

Sensibilidad

La sensibilidad de la técnica CAPILLARYS URINE con cuantificación, obtenida por dilución serial en una orina normal de una orina con proteína de Bence Jones, con una concentración inicial del orden de 1,44 g/L por integración hasta la línea de base y de 1,39 g/L por integración de valle a valle, es tal que el límite de cuantificación de una proteína de Bence Jones es del orden de 150 mg/L para los dos modos de integración.

NOTA : El límite de cuantificación de un pico monoclonal puede variar en función de la posición del pico monoclonal y del fondo policlonal de la zona de las gamma y betaglobulinas.

TÉCNICA MINICAP URINE

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.

1. KIT MINICAP PROTEIN(E) 6 (SEBIA, REFERENCIA 2203)

Presentación, conservación, estabilidad y señales de deterioro

Ver las instrucciones del kit.

IMPORTANTE : Los reactivos contenidos en el kit MINICAP PROTEIN(E) 6 son necesarios para la realización de la técnica MINICAP URINE.

2. SUERO CONTROL NORMAL

Composición

El Suero Control Normal (SEBIA, referencia n° 4785) se obtiene a partir de una mezcla de sueros humanos normales. Un procedimiento de estabilización permite conservar el Suero Control Normal en forma liofilizada.

Aplicación

El Suero Control Normal está destinado, antes de iniciar una nueva serie de análisis, a la normalización de los capilares y al control de migración de las proteínas urinarias separadas con la técnica electroforética MINICAP URINE.
Reconstituya cada vial liofilizado del Suero Control Normal con 1 mL de agua destilada o desionizada. Deje reposar 30 minutos y agite suavemente (evite la formación de espuma).
El Suero Control Normal reconstituido debe ser usado como un suero humano normal.

Ver el párrafo "Preparación del análisis electroforético" para la normalización de los capilares.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Antes de la reconstitución, el Suero Control Normal debe conservarse en nevera hasta la fecha de caducidad indicada en los viales o la caja.
El Suero Control Normal reconstituido debe conservarse en nevera y usarse en el plazo de una semana para evitar que se contamine o desnaturalice.
Puede congelarse (en alícuotas) y conservarse un máximo de 6 meses a - 18 / - 30 °C.
El Suero Control Normal descongelado debe conservarse en nevera y usarse ese mismo día.

NOTA : Para un uso óptimo del Suero Control Normal en el MINICAP, se recomienda alicuotarlo en microtubos antes de congelarlo.

NOTA : Durante el transporte, el Suero Control liofilizado puede permanecer a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) durante 15 días sin que la calidad del test se vea afectada.

Como ningún test puede proporcionar una garantía absoluta de la ausencia de los virus VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C o de cualquier otro agente infeccioso, el Suero Control Normal debe ser manipulado con las precauciones habituales para evitar contaminarse.
Este suero control, analizado usando técnicas aceptadas por una autoridad competente (FDA, ANSM…), es negativo :
- para la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B,
- para la presencia de anticuerpos anti-VHC,
- para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y anti-VIH 2.

3. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

Uso

Para la dilución de las muestras de orina, si es necesario, y la primera diálisis (ver "Preparación de las muestras").
Para lavar los capilares del sistema automático para electroforesis capilar, MINICAP, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm) y con una resistividad superior a 10 Megaohmios x cm.
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas.
Para un funcionamiento óptimo, se recomienda añadir 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia n° 2059 : 1 vial de 5 mL).

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de limpieza, se recomienda lavarlo con agua destilada o desionizada en abundancia.

4. CAPICLEAN

Presentación

El vial de solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia n° 2058 : 1 vial de 25 mL) contiene : enzimas proteolíticos, surfactantes y componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del instrumento de electroforesis capilar, MINICAP, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.

IMPORTANTE : Realice un ciclo de limpieza con CAPICLEAN al menos una vez por semana y, como máximo, una vez al día, o cada 500 análisis cuando se hayan realizado en menos de una semana.

Ver las instrucciones del CAPICLEAN, SEBIA.

IMPORTANTE : Para un uso óptimo del CAPICLEAN en el MINICAP, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que sirve de soporte al microtubo que contiene la solución CAPICLEAN diluida (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO CONGELAR.
Puede observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial de CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.
No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.
Para un uso diferido, coloque el tubo que contenga la solución diluida en nevera. Debe usarse durante el día.

5. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 - 3 % de cloro a partir de una dosis concentrada de 250 mL con un 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, MINICAP, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar cualquier proteína que se haya adsorbido a la cánula).

Ver el manual de instrucciones del MINICAP, SEBIA.

- Dispense 500 µL de solución de hipoclorito de sodio, preparada anteriormente, en un microtubo.
- Corte el tapón del microtubo.
- Ponga el microtubo, colocado en un tubo de hemólisis nuevo que servirá de soporte (identificado con una etiqueta con el código de barras específico de la solución de hipoclorito de sodio), en la posición 1 del carrusel del MINICAP.
- Ponga una cubeta de reactivo nueva en el cargador del MINICAP previsto a este efecto (en caso de ausencia de cubetas aparecerá un mensaje de advertencia).
- Introduzca el carrusel en el MINICAP.
- Cierre las puertas del MINICAP, el ciclo de limpieza comenzará automáticamente.

IMPORTANTE : Para un uso óptimo de la solución de hipoclorito de sodio en el MINICAP, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que sirve de soporte al microtubo que contiene la solución (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio diluida puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de la luz solar y de cualquier fuente de calor o de ignición, y alejado de ácidos y amoniaco.

6. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

Preparación

Cada vial de solución de lavado concentrada CAPILLARYS / MINICAP (SEBIA, referencia n° 2052 : 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Para el MINICAP, se recomienda diluir sólo 25 mL de la solución concentrada hasta 250 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina pH ≈ 12.

Uso

Para lavar los capilares del MINICAP.

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial. La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

NOTAS :

Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final de un ± 5 % no tiene ningún efecto adverso en el análisis.
El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro ≤ 0,45 µm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar MINICAP SEBIA, referencia n° 1230.
2. Carrusel, suministrado con el sistema MINICAP.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema MINICAP : contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada) y contenedor de desechos.
4. Cubetas de reactivo MINICAP SEBIA (por 250), referencia n° 2280.
5. Tapas para las cajas de cubetas de reactivo MINICAP usadas (por 12), referencia n° 2286 : tapas destinadas a cerrar las cajas para cubetas usadas.
6. Sistema de diálisis SEBIA, referencia n° 9200, 24 tubos de 20 mL con membrana PES 10 000 MWCO (peso molecular de corte de 10 KDa), para la diálisis y concentración de las muestras,
   o cualquier otro sistema de funcionamiento equivalente, homologado para su uso en análisis clínicos, que permita obtener un volumen final de muestra dializada y concentrada de 500 µL (volumen necesario para realizar los análisis con las técnicas MINICAP URINE y MINICAP IMMUNOTYPING URINE).

   IMPORTANTE : Lea detenidamente las instrucciones de cada dispositivo de diálisis y concentración.
7. Centrífuga con rotor basculante equipada con soportes para tubos de 30 mm de diámetro y 116 mm de longitud para la utilización de los sistemas de diálisis SEBIA.
8. Pipetas de 200 µL, 1 mL y 5 mL.
9. Microtubos de 1,5 mL.
10. Tubos de hemólisis de 75 mm de altura y 13 mm de diámetro.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras

El análisis se realiza preferentemente con orinas frescas de 24 horas. Las orinas deben ser obtenidas según los procedimientos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las muestras pueden conservarse una semana en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones prolongadas, se recomienda congelar las muestras a – 70 °C ; las muestras congeladas son estables un mínimo de 1 mes.

IMPORTANTE : No congele las muestras a – 20 °C.

Las muestras degradadas o descongeladas pueden presentar fracciones deformadas con aparición de pequeños picos adicionales debido a la degradación de las proteínas.

NOTA : No conserve las muestras de orina a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras (con los sistemas de diálisis SEBIA)

Para una recuperación óptima de las proteínas urinarias, lo más recomendable es usar un concentrador de centrífuga para las etapas de diálisis / concentración.

IMPORTANTE : La técnica de análisis de las orinas mediante electroforesis capilar requiere la diálisis y concentración de las muestras con sistemas de diálisis SEBIA (tubos de 20 mL). Use un tubo por muestra.

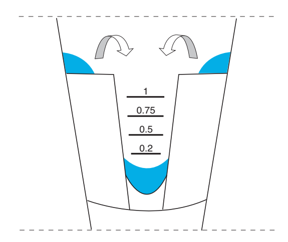
Los parámetros indicados son aplicables a la utilización de los sistemas de diálisis SEBIA en centrífugas de rotor basculante. Lea detenidamente las instrucciones de los diferentes dispositivos de diálisis y concentración para su uso en centrífugas de rotor angular.

Antes del análisis, prepare cada muestra según el modo operatorio siguiente :

NOTA : Diluya previamente a ½ (v/v) el tampón de diálisis concentrado con agua destilada o desionizada (1 volumen de tampón + 1 volumen de agua destilada o desionizada).

1. Mida la concentración de proteínas totales de la muestra de orina a analizar.
2. Centrifugue 5 mL de orina neta durante 10 minutos a 4.300 g*.
3. Recupere el sobrenadante.
4. Prepare cada muestra en un sistema de diálisis nuevo según su concentración de proteínas totales :
   - Concentración de proteínas totales inferior a 1 g/L : Mezcle 2 mL de orina con 18 mL de agua destilada o desionizada,
   - Concentración de proteínas totales comprendida entre 1 y 3 g/L : Mezcle 0,5 mL de orina con 19,5 mL de agua destilada o desionizada,
   - Concentración de proteínas totales superior a 3 g/L : Diluya primero la orina con agua destilada o desionizada para obtener una concentración de proteínas totales del orden de 3 g/L. Luego, mezcle 0,5 mL de orina diluida con 19,5 mL de agua destilada o desionizada.
5. Homogeneíce la orina diluida.
6. Equilibre los tubos con agua destilada o desionizada y centrifugue durante 40 minutos a 4.000 g*.

   ATENCIÓN : El volumen obtenido tras la concentración por centrifugación debe ser inferior o igual a 0,5 mL.
7. Para la diálisis, complete el sistema de diálisis hasta 20 mL con tampón de diálisis diluido.
8. Equilibre los tubos con tampón de diálisis diluido y centrifugue de nuevo durante 40 minutos a 4.000 g*.
9. Después de la centrifugación, una parte de la muestra puede permanecer retenida en la zona plana superior del sistema de diálisis (ver el esquema adjunto). Con una micropipeta, transfiera esta parte de la muestra al pocillo inferior del sistema de diálisis. Si el volumen obtenido es inferior a 0,5 mL, ajuste el contenido del tubo hasta 0,5 mL (cuando la parte inferior del menisco se haya equilibrado) con tampón de diálisis diluido.



10. Homogeneíce el contenido del tubo.
11. Tome el contenido del tubo (orina dializada) y dispénselo en un microtubo de 1,5 mL.
12. Deseche el sistema de diálisis.

IMPORTANTE : Las muestras deben ser analizadas como mucho el día siguiente a su preparación. Para limitar la adsorción de las proteínas urinarias en la membrana del dispositivo de diálisis y concentración (sistema de diálisis SEBIA), se recomienda no conservar la muestra en el sistema de diálisis después de la centrifugación, sino en un microtubo conservado en nevera (entre 2 y 8 °C).

** Consulte las instrucciones de la centrífuga para calcular el número de revoluciones por minuto correspondiente al tipo de rotor usado.*

Las condiciones de utilización de los dispositivos de diálisis y concentración son diferentes en las centrífugas de rotor basculante y en las de rotor angular. Los parámetros indicados anteriormente son aplicables a la utilización de los sistemas de diálisis SEBIA en centrífugas de rotor basculante. Lea detenidamente las instrucciones de los diferentes dispositivos de diálisis y concentración para su uso en centrífugas de rotor angular.

Muestras a descartar

- No use muestras de orina antiguas o mal conservadas, ya que las fracciones estarían muy modificadas debido a la degradación de las proteínas urinarias.
- Se recomienda observar el aspecto de la orina después de la primera centrifugación (10 minutos a 4.300 g) (por si hay hemólisis o turbidez).
- No use muestras que hayan sido conservadas en un dispositivo de diálisis y concentración, ya que algunas proteínas podrían haberse adsorbido a la membrana.
- No reutilice una muestra de orina que haya sido dispensada en la cubeta de reactivo.

PROCEDIMIENTO

El MINICAP es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las proteínas urinarias en 2 capilares en paralelo según las etapas siguientes :

- lectura de los códigos de barras de las muestras a analizar (hasta 26) y del carrusel ;
- dispensación de las muestras en las cubetas de reactivo a partir de los microtubos que contienen las muestras dializadas ;
- lavado de los capilares ;
- inyección de las muestras ;
- separación y detección directa de las proteínas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes :

- preparación (diálisis y concentración) de las muestras ;
- colocación de los microtubos (sin tapones) que contienen las muestras a analizar en los tubos de hemólisis que les servirán de soporte en el carrusel, en las posiciones 1 a 26 ; cada tubo debe estar identificado con el código de barras de identificación específico correspondiente a la muestra a analizar ;
- colocación del Suero Control Normal en la posición nº 28 del carrusel ;
- introducción en el sistema MINICAP ;
- recuperación del carrusel después del análisis y de los microtubos para su eventual análisis mediante inmunotipado ;
- recuperación y cierre de las cajas para cubetas usadas.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL MINICAP.

I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Encienda el MINICAP y el ordenador de control.
2. Para la inicialización del aparato, coloque al menos una cubeta de reactivo nueva en el cargador del MINICAP previsto a tal efecto (en caso de ausencia de cubetas aparecerá un mensaje de advertencia).
3. Abra el programa de gestión Phoresis y valide el nivel de los reactivos y los desechos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente.
4. Las muestras preparadas deben ser analizadas con el programa de análisis "URINE" y el tampón de análisis MINICAP PROTEIN(E) 6. Para seleccionar el programa de análisis "URINE" y conectar el contenedor de tampón MINICAP PROTEIN(E) 6 en la posición "B1" del aparato, lea detenidamente el manual de instrucciones del MINICAP y siga las indicaciones que aparecerán en pantalla.
5. Ponga cubetas de reactivo nuevas en el cargador del MINICAP previsto a este efecto (en caso de ausencia de cubetas aparecerá un mensaje de advertencia).
6. Ponga una caja para cubetas usadas en el MINICAP en el lugar previsto a este efecto.
7. Compruebe el nivel de llenado de los diferentes contenedores de reactivo, complete los volúmenes si es necesario, y vacíe el contenedor de desechos. En la ventana "Verificar el nivel de los contenedores", actualice los niveles de los reactivos mediante los cursores.
8. El carrusel tiene 28 posiciones para tubos. Para analizar las muestras preparadas con el kit CAPILLARYS / MINICAP URINE :
   - Ponga hasta 26 tubos de hemólisis vacíos (que servirán de soporte para los microtubos) en el carrusel (posiciones 1 a 26) comenzando por la posición nº 1, y luego los microtubos que contengan las muestras dializadas, cortando antes el tapón de cada microtubo y colocando el código de barras de cada tubo orientado hacia la ventana de lectura.

     IMPORTANTE : Se recomienda identificar los tubos de hemólisis que servirán de soporte a los microtubos que contengan las muestras a analizar con las etiquetas con código de barras de identificación correspondientes a las muestras. Esta identificación permitirá seleccionar el modo de dilución necesario para la técnica MINICAP IMMUNOTYPING URINE. En caso de ausencia del código de barras, utilice la función del programa que permite asociar la posición del tubo en el carrusel al modo de dilución deseado para la técnica MINICAP IMMUNOTYPING URINE.
   - Conserve los tapones de cada microtubo para la conservación posterior de las muestras, si es necesario.
   - Si el número de muestras a analizar es impar, añada un tubo con agua destilada o desionizada.
   - Para normalizar los capilares con el Suero Control Normal (ver el párrafo "Reactivos necesarios no suministrados"), dispense en un tubo de hemólisis 25 µL de Suero Control Normal reconstituido y 2 mL de tampón de diálisis diluido ; homogeneíce bien la mezcla y coloque este tubo en la posición 28 del carrusel (posición "Control").

     IMPORTANTE : Es necesario normalizar los capilares antes de analizar muestras de orina en el sistema MINICAP para poder analizarlas después con la técnica MINICAP IMMUNOTYPING URINE. Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los datos.

   IMPORTANTE : En caso de ausencia de tubos en las posiciones nº 1 (muestra) y 28 (Suero Control Normal), el análisis no puede comenzar y aparece un mensaje de advertencia.

   NOTA : Al usar el Suero Control Normal, es indispensable usar la etiqueta con el código de barras específico prevista a este efecto.
9. Introduzca el carrusel en el MINICAP.
10. Cierre las puertas del MINICAP e inicie el análisis.
11. Después del análisis, saque el carrusel y los microtubos que contengan las muestras de orina analizadas y consérvelas en nevera (entre 2 y 8 °C) para un análisis posterior con la técnica MINICAP IMMUNOTYPING URINE, si es necesario.
12. Si es necesario, quite con precaución la caja que contiene las cubetas de reactivo usadas, ciérrela herméticamente usando una de las tapas destinadas a este efecto y deséchela.

    ATENCIÓN : Manipule con precaución las cajas que contengan las cubetas de reactivo usadas, ya que pueden contener muestras biológicas.

DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras de las muestras de orina a analizar y del carrusel.
2. Distribución de las muestras en las cubetas de reactivo, con limpieza de la cánula de muestras entre cada muestra.
3. Lavado de los capilares.
4. Inyección de las muestras en los capilares.
5. Migración a voltaje constante con temperatura regulada por efecto Peltier, durante unos 4 minutos.
6. Lectura a 200 nm y aparición simultánea del perfil proteico en la pantalla del ordenador.

NOTA : Estas etapas se realizan consecutivamente para los 2 primeros tubos analizados : los perfiles correspondientes a las muestras analizadas se obtienen al cabo de unos 10 minutos. Para los tubos siguientes, las fases 1 y 2 (lectura de los códigos de barras y distribución de las muestras) se realizan durante el análisis (migración) de los 2 tubos anteriores.

II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al final del análisis, los perfiles electroforéticos pueden ser examinados visualmente para detectar las anomalías. Las posiciones de las diferentes zonas proteicas (Albúmina, Alfa 1, Alfa 2, Beta y Gamma) aparecen en la ventana de edición y en el informe de resultados.

NOTA : En cada uno de los 3 protocolos de preparación de la muestra, la amplitud de la curva mostrada en la pantalla refleja la concentración de proteínas totales de la muestra analizada.

Para el inmunotipado, los picos anormales deben ser integrados con la herramienta de integración de picos del programa, y el "Ratio orina", definido por la proporción de la superficie del pico anormal respecto a la superficie total de las proteínas del Suero Control Normal, es entonces calculado automáticamente ; aparecerá en la ventana de edición de las curvas. Este ratio será usado en la técnica MINICAP IMMUNOTYPING URINE para determinar el modo de dilución de la muestra que se aplicará ("HIPOGAMMA", "ESTÁNDAR" o "HIPERGAMMA").

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL MINICAP.

III. FIN DE LA SECUENCIA DE ANÁLISIS

El usuario debe realizar un procedimiento de extinción al final de la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

IMPORTANTE : Coloque una cubeta de reactivo nueva en el cargador del MINICAP previsto a este efecto (en caso de ausencia de cubetas aparecerá un mensaje de advertencia).

IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El sistema automático MINICAP permite una gestión automática de los reactivos.

IMPORTANTE : Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores y respetar el código de colores contenedor – conector en cada cambio de reactivos.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos :

- colocar un nuevo contenedor de tampón de análisis y / o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y / o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y / o,
- vaciar el contenedor de desechos.

ATENCIÓN : No use agua destilada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultra pura, como el agua para inyección.

IMPORTANTE : Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL MINICAP.

RESULTADOS

Interpretación

La interpretación es cualitativa.

Para facilitar la interpretación de los perfiles, se recomienda superponer un perfil obtenido en la normalización de los capilares con el Suero Control Normal, para obtener un perfil de referencia.

Proteinuria fisiológica : Es débil, en general inferior a 120 mg / 24 horas. No hay diferencias significativas entre los perfiles obtenidos en hombres y mujeres. La proteína predominante es la albúmina, asociada eventualmente a la transferrina y a trazas de inmunoglobulinas. Toda proteinuria superior a 120 mg / 24 horas debe ser considerada patológica.
Una proteinuria positiva (> 120 mg / 24 horas) deberían ser examinada con más detalle mediante un análisis cualitativo de las proteínas eliminadas.

La electroforesis de orina se realiza para investigar la presencia de componentes monoclonales, en particular las proteínas de Bence Jones (o cadenas ligeras libres monoclonales), o de otras proteínas urinarias. Una deformación del perfil respecto al normal es indicadora de una anomalía, especialmente la aparición de un pico adicional en la zona de las gammaglobulinas o de las betaglobulinas.
La tecnología de la electroforesis de orina permite obtener un límite de detección de las bandas monoclonales (inmunoglobulinas monoclonales o cadenas ligeras libres monoclonales) de unos 20 mg/L, satisfactorio para la mayoría de casos clínicos.
Todos los perfiles de aspecto monoclonal u oligoclonal deben ser confirmados usando :

- el kit de inmunotipado de SEBIA, MINICAP IMMUNOTYPING URINE ó,
- los kits inmunofijación de SEBIA, HYDRAGEL BENCE JONES, HYDRAGEL IF ó HYDRAGEL URINE PROFIL(E), con los antisueros específicos anti-cadenas ligeras libres kappa o lambda.

Es necesario realizar análisis complementarios mediante electroforesis con las técnicas de SEBIA, HYDRAGEL PROTEINURIE ó HYDRAGEL URINE PROFIL(E), o mediante determinaciones nefelométricas, para caracterizar las nefropatías tubulares, glomerulares o mixtas sospechadas después del análisis por electroforesis capilar.
Para obtener información complementaria sobre la interpretación de los perfiles obtenidos, ver la BIBLIOGRAFÍA.

Casos especiales :
- *Las orinas con una concentración inicial de proteínas totales inferior a 0,15 g/L pueden presentar un fondo proteico (arrastre) en todo el perfil.*
- *Cualquier anomalía sospechada en las zonas Beta o Gamma requiere la investigación posterior de la presencia de la proteína de Bence Jones, sea cual sea la concentración de proteínas totales de la muestra.*

Interferencias y limitaciones

Ver MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.

Analice únicamente muestras preparadas usando los dispositivos de diálisis y concentración recomendados en el párrafo "EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS", como los sistemas de diálisis SEBIA o cualquier sistema de funcionamiento equivalente homologado para su uso en diagnóstico clínico.
Una diálisis insuficiente de la muestra puede provocar la aparición de picos residuales no proteicos. En caso de sospechar una interferencia, se recomienda realizar una diálisis adicional de la muestra.
Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no hay garantías en cuanto a la detección total de todas las proteínas urinarias.

Asistencia técnica

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como la información relativa a la limpieza y eliminación de residuos, a las reglas de etiquetado y seguridad aplicadas por SEBIA, al embalaje para el transporte de muestras biológicas y a la descontaminación de los aparatos están disponibles en el DVD "INSTRUCTIONS & SAFETY DATA SHEETS".

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Exactitud

Cuarenta y seis muestras de orina diferentes, con concentraciones de proteínas totales comprendidas entre 0,05 y 11,96 g/L, de las que 1 es normal y 45 patológicas, han sido analizadas mediante electroforesis capilar en el sistema MINICAP con la técnica MINICAP URINE y otro sistema comercial de análisis de las proteínas urinarias por electroforesis capilar.
Los resultados obtenidos muestran una correlación perfecta entre los dos sistemas de análisis en la detección de anomalías del perfil proteico, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % respecto a la técnica comparada, calculadas según el método recomendado (Wendling, 1986) :
En la muestra de orina normal : correlación perfecta.
En las 45 muestras de orina patológicas : correlación perfecta.

BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

1. Cameron JS. 1987. The nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*, 10 : 157-171.
2. Chopin N. 1991. Étude de la protéinurie. *Inf Tech Biol*, 1 : 23-28.
3. Henskens Y *et al*. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. *Clin Chem*, 44, 1184-1190 (1998).
4. Jellum E *et al*. Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr* B, 689, 155-164 (1997).
5. Joachim GR, Cameron JS, Chwartz M, Belker EL. 1964. Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome. *J Clin Invest,* 43, 2332-2346.
6. Landers JP. Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin Chem*, 41, 495-509 (1995).
7. Le Bricon T. 2002. Identification et dosage des proteines urinaires au laboratoire d'analyses. *Ann Biol Clin*, 60 : 525-540.
8. Le Carrer D. 1990. Protéinuries : Mise au point sur leur exploration biologique en 1990. *L'Eurobiologiste*, 190 : 395-405.
9. Le Carrer D, Nicolas A, Ducasse L. 1992. L'analyse des protéinuries au laboratoire de biologie en 1992. *Revue française des laboratoires*, 225 : 41-47.
10. Le Carrer D, Chopin N. 1994. Profil protéique urinaire : Proposition d'un protocole d'exploration biologique des protéinuries. *Revue française des laboratoires*, 269 : 29-37.
11. Philipon C. 1989. Protéines urinaires : Intérêt clinique et interprétation. *Technique et Biologie*, 6 : 239-249.
12. Oda RP *et al*. Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. *Electrophoresis*, 18, 1715-1723 (1997).
13. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. 1989. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem*, 35 : 755-765.
14. Westermeier R., "Electrophoresis in Practice. A Guide to Theory and Practice", VCH Publishers, New York, NY, 1993.
15. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat*, 1986 ; Sept : 93-97.
16. JB Oudart *et al* (2014) Place des explorations urinaires dans le diagnostic et le suivi des gammapathies monoclonales en pratique quotidienne. *Ann. Biol. Clin.*, 72 (2) : 147 – 152.

SCHÉMAS / FIGURES

Figure 1

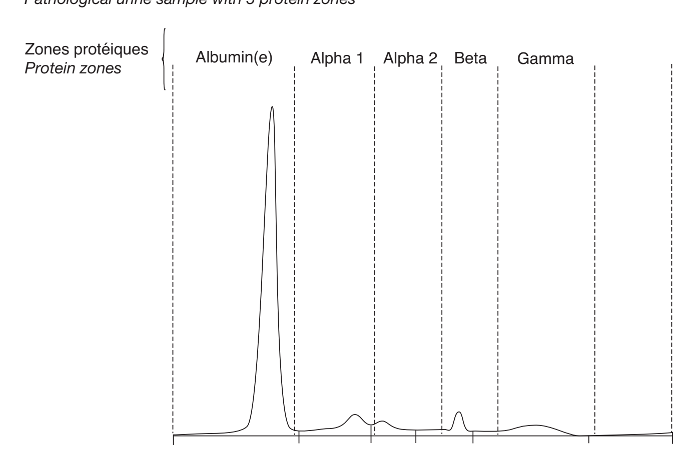
Urine normale
Normal

Zones protéiques
Protein zones

Albumin(e) | Alpha 1 | Alpha 2 | Beta | Gamma

Figure 2

Urine pathologique avec 5 zones protéiques
Pathological urine sample with 5 protein zones



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 3

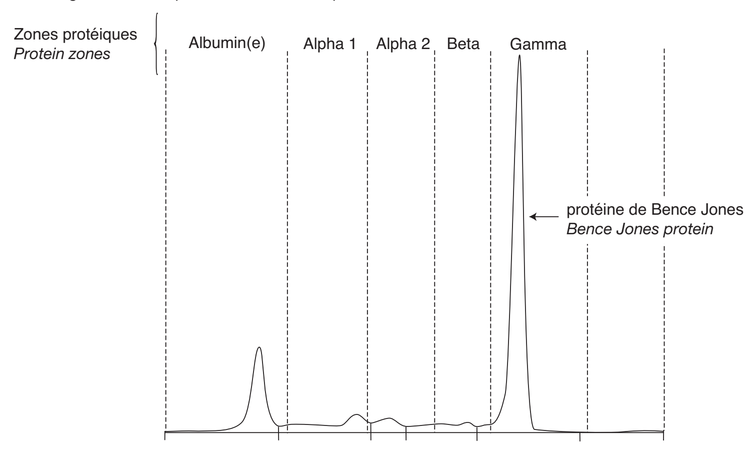
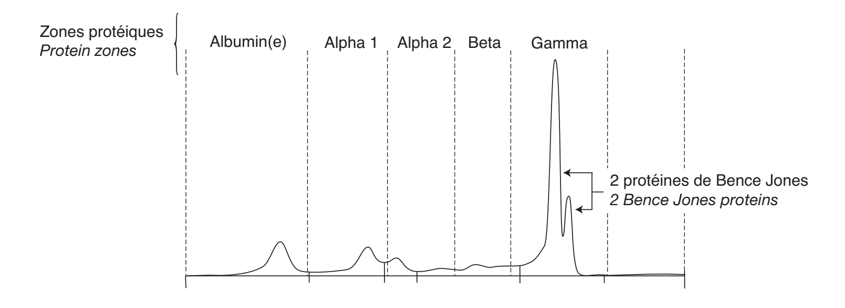


Figure 4



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 5

Profil de référence : Sérum de Contrôle Normal dilué au 1/40
Reference pattern : Normal Control Serum diluted 40 times

